

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

28 SEP 2004
28.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 3月29日

出 願 番 号
Application Number:

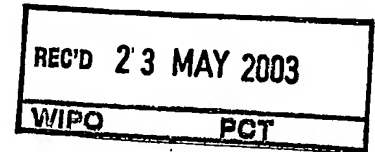
特願2002-097407

[ST.10/C]:

[JP2002-097407]

出 願 人
Applicant(s):

富士レビオ株式会社

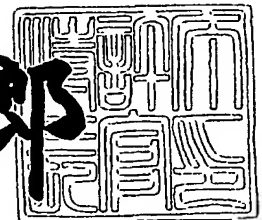


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033454

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 01724

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

 【氏名】 堀田 佳之

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

 【氏名】 長谷川 亜矢子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都中央区日本橋浜町2丁目6番5号 富士レビオ株式会社内

 【氏名】 伊藤 哲

【特許出願人】

 【識別番号】 000237204

 【氏名又は名称】 富士レビオ株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088546

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 谷川 英次郎

 【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 053235

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標的核酸の測定方法及びそのためのキット

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的核酸と、該標的核酸とハイブリダイズする、標識された核酸から成る標識プローブと、前記標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸から成る非標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸が支持体に結合されて成る固相化プローブとを反応させ、前記支持体に結合された前記標識プローブの標識を測定することから成る標的核酸の測定方法であって、前記非標識プローブがハイブリダイズする領域の端部領域と、前記固相化プローブがハイブリダイズする領域の端部領域とが重複している、標的核酸の測定方法。

【請求項2】 重複している領域の塩基数が1塩基ないし5塩基である請求項1記載の方法。

【請求項3】 重複している領域の塩基数が1塩基ないし3塩基である請求項2記載の方法。

【請求項4】 前記非標識プローブの5'末端領域がハイブリダイズする領域と、前記固相化プローブの3'末端領域がハイブリダイズする領域とが重複している請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 標的核酸の変異型が存在し、変異している部位が、前記固相化プローブがハイブリダイズする領域内に位置する請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 前記変異している部位が、前記重複している領域から1塩基ないし5塩基離れた位置にある請求項5記載の方法。

【請求項7】 標的核酸又は標的核酸の一塩基変異多型を有する変異型核酸を含む被検試料に対して請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法を適用し、測定結果から被検試料中の核酸が標的核酸か変異型核酸かを判定することを含む、一塩基変異多型の検出方法。

【請求項8】 正常型遺伝子と、一塩基変異多型を含む異常型遺伝子とが対

立遺伝子になっている、該遺伝子を含む被検試料に対して請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法を適用し、測定結果から被検試料中の前記遺伝子の接合型を判定することを含む、遺伝子の接合型の判定方法。

【請求項 9】 前記標識プローブと、前記非標識プローブと、前記固相化プローブとを少なくとも含み、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法に用いられる核酸測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標的核酸の測定方法及びそのためのキットに関する。本発明の方法は、一塩基変異多型(SNP)の検出や遺伝子の接合型の判定に有用である。

【0002】

【従来の技術】

核酸の変異の判定は、単離した核酸を制限酵素によって切断し、ゲル（アガロース、アクリルアミドなど）上で核酸断片を電気泳動によって検出する方法で行われている。しかし、この手法は、制限酵素による核酸の切断に時間がかかり電気泳動による手間が要する。さらに、発癌性のエチレンブロマイドを使用するため、その廃棄には特別の配慮を必要とする。

【0003】

他にDNAシーケンス、DNAチップなどの技術によるSNP解析も行われているが、熟練した技術の必要性やコストなどの欠点がある。

【0004】

また、Cytometry 39: 131-140 (2000)に記載された方法は、標的核酸と、標的核酸に相補的な蛍光色素標識プローブと、標識プローブに隣接した標的核酸と相補的な塩基配列部分および粒子固相化プローブと相補的な塩基配列を持つプローブをハイブリダイズし、ライゲースによるライゲーションを行い、次に粒子固相化プローブとハイブリダイズさせ、粒子に結合した標識プローブの蛍光強度をフローサイトメータで測定する方法である。二つのプローブの隣接配列に変異配列が存在するとライゲーションは成立せず、粒子には標識プローブが結合せず、蛍

光は観察されない。その差を用い標的核酸の有無を判定する。この測定法はライゲーション操作後、再度ハイブリダイゼーション操作を行うため時間がかかる欠点を有する。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、熟練した技術を要することなく、簡便に短時間でSNPの検出や標的核酸の定量を行うことができる標的核酸の測定方法を提供することである。

【0006】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、標的核酸と、該標的核酸とハイブリダイズする固相化プローブ、および標識プローブとを反応させ、支持体に結合された標識を測定することにより標的核酸を測定する方法を採用するとともに、固相化プローブがハイブリダイズする領域の端部領域に、端部が重複する領域とハイブリダイズする非標識プローブをさらに反応させることにより、驚くべきことに、固相化プローブと標的核酸との反応の特異性が高まり、一塩基の相違も識別可能になることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、標的核酸と、標的核酸とハイブリダイズする、標識された核酸から成る標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸から成る非標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸が支持体に結合されて成る固相化プローブとを反応させ、前記支持体に結合された前記標識プローブの標識を測定することから成る標的核酸の測定方法であって、前記非標識プローブがハイブリダイズする領域の端部領域と、前記固相化プローブがハイブリダイズする領域の端部領域とが重複している、標的核酸の測定方法を提供する。また、本発明は、標的核酸又は標的核酸の一塩基変異多型を有する変異型核酸を含む被検試料に対して上記本発明の方法を適用し、測定結果から被検試料中の核酸が標的核酸か変異型核酸かを判定することを含む、一塩基変異多型の検出方法を

提供する。さらに、本発明は、正常型遺伝子と、一塩基変異多型を含む異常型遺伝子とが対立遺伝子になっている、該遺伝子を含む被検試料に対して上記本発明の方法を適用し、測定結果から被検試料中の前記遺伝子の接合型を判定することを含む、遺伝子の接合型の判定方法を提供する。さらに、本発明は、前記標識プローブと、前記非標識プローブと、前記固相化プローブとを少なくとも含み、上記本発明の方法に用いられる核酸測定用キットを提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の方法の一例を図1のAに示す模式図に基づき説明する。上述の通り、本発明の方法は、標的核酸10と、標識プローブ12と、固相化プローブ14と、非標識体プローブ16とをアニールすることにより、標的核酸10と、標識プローブ12、固相化プローブ14及び非標識体プローブ16とをそれぞれハイブリダイズさせ、固相化プローブ14を固相化している支持体18に、標的核酸10を介して結合された標識プローブ12の標識19を測定することにより、被検試料中の標的核酸10を測定するものである。

【0009】

以下、各構成要素について詳細に説明する。標的核酸10は、測定しようとする核酸であり、何ら限定されるものではない。例として、ヒトやその他の生物のゲノミック遺伝子、cDNA、病原性の微生物やウイルスの遺伝子等を挙げることが出来るがこれらに限定されるものではない。本発明の方法は、一塩基の相違さえ識別することができる特異性の高い方法であるので、SNPの検出に適用可能であるから、標的核酸が、このようなSNPを検出しようとする核酸である場合には特に威力を発揮する。標的核酸は、DNAでもRNAでもよく、また、これらとハイブリダイズすることが可能な人工核酸であってもよい。標的核酸は、PCRのような核酸増幅法で増幅されたものであってもよいし、増幅されていない核酸であってもよい。なお、本明細書において、「測定」には、検出と定量の両者が包含される。標的核酸のサイズは、特に限定されないが、3種類のプローブとハイブリダイズする必要があるので、通常、40塩基以上、好ましくは60塩基以上のサイズを有する。標的核酸のサイズの上限は特にないが、通常、100～

500塩基程度が好ましい。

【0010】

標識プローブ12は、標的核酸内の一領域とハイブリダイズする核酸を標識したものである。標識プローブは、これがハイブリダイズする標的核酸内の領域（以下、「標識プローブハイブリダイズ領域」ということがある）と相補的な塩基配列を有していることが好ましいが、非標識プローブ及び固相化プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーション条件下において標的核酸とハイブリダイズできるものであれば、通常10%以下、特に5%以下程度の数の非相補的なヌクレオチドを含んでいてもよい。標識プローブのサイズは、特に限定されるものではなく、標的核酸の検出に有効なサイズを有していればよく、15塩基以上が好ましく、特に20～50塩基程度が好ましい。標識プローブに結合される標識は、プローブを測定できるものであればいずれのものであってもよく、従来の標識プローブに用いられているいずれの標識をも採用することができる。すなわち、蛍光標識、放射標識、酵素標識、ビオチン標識等を挙げることができる。これらのうち、高価な装置を用いることなく安全に測定可能で、標的核酸とのハイブリダイゼーションに干渉しない点から、蛍光標識が好ましい。標識は、プローブのどの部分に結合してもよく、このような結合は周知の方法により行うことができる。また、プローブは、DNAでもRNAでもよく、また、これらとハイブリダイズすることが可能な人工核酸であってもよい。

【0011】

固相化プローブ14は、前記標的核酸10内の領域であって前記標識プローブハイブリダイズ領域とは異なる領域（以下、「固相化プローブハイブリダイズ領域」ということがある）と相補的な塩基配列を有する核酸を、支持体上に固相化したものである。固相化プローブのサイズは、特に限定されるものではなく、標的核酸の検出に有効なサイズを有していればよく、15塩基以上が好ましく、特に20～50塩基程度が好ましい。支持体としては、核酸を固相化できるものであればいずれのものであってもよく、ポリスチレン粒子、ガラス粒子、ラテックス粒子等の粒子、これらにフェライト等を配合して磁力を与えた磁性粒子、マイクロプレートのウェルの内壁等を挙げることができる。固相化プローブと標的核

酸とのハイブリダイゼーションが妨げられないように、支持体は核酸の末端に結合することが好ましい。核酸の支持体への固相化は、周知の方法により行うことができ、核酸を結合しやすいようにカルボキシル基等の官能基を表面に結合したポリスチレン粒子等が市販されているので、このような市販の核酸固相化用粒子を好ましく用いることができる。なお、固相化プローブ14の核酸は、支持体18に直接結合されていてもよいし、標的核酸とのハイブリダイゼーションに関与しない塩基配列を有するスペーサー領域を介して支持体に結合されていてもよい。このように、固相化プローブハイブリダイズ領域と相補的な配列を有する核酸が、スペーサー領域を介して間接的に支持体に結合されている場合も、本発明で言う「相補的な塩基配列を有する核酸が支持体に結合されて」いる場合に該当する。

【0012】

非標識プローブ16は、標的核酸10内の、標識プローブハイブリダイズ領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸である。非標識プローブのサイズは、特に限定されるものではなく、標的核酸の検出に有効なサイズを有していればよく、15塩基以上が好ましく、特に20～50塩基程度が好ましい。

【0013】

非標識プローブハイブリダイズ領域と、固相化プローブハイブリダイズ領域とは、互いの端部領域が重複している（以下、この重複している部分を「重複領域」と言うことがある）。重複領域は、図1のA中、参照番号20で示されている。重複領域のサイズは、特に限定されないが、1塩基～5塩基が好ましく、さらに1塩基～3塩基が好ましい。このような重複領域20を設けることにより、固相化プローブ14と標的核酸10との反応の特異性が高まり、一塩基の相違でも識別できるようになる。

【0014】

本発明の方法は、標的核酸の変異型、とりわけSNPが存在する場合に、このような一塩基変異を区別して標的核酸を特異的に測定できるという優れた効果を発揮するものであるが、このような変異を区別して標的核酸を特異的に測定する場合には、この変異が起きる部位が、固相化プローブハイブリダイズ領域中に位置

するように、固相化プローブを設定する。変異している部位が、重複領域20から1塩基（重複領域の端部に隣接する）ないし5塩基離れた位置にあることが好ましい。なお、図1のA中、標的核酸10上の、変異する塩基の部位をYで示す。また、Yに対合する固相化プローブ14内の塩基をXで示す。なお、本明細書の説明においては、標的核酸と変異している核酸を変異型と呼んでおり、変異型が必ずしも異常型を意味するわけではない。異常型の遺伝子の検出を目的にして異常型を標的核酸とする場合には、正常型が変異型になる。

【0015】

なお、図1のAに示す例では、固相化プローブハイブリダイズ領域の5'末端領域と、非標識プローブハイブリダイズ領域の3'末端領域とが重複しているが、これとは逆に固相化プローブハイブリダイズ領域の3'末端領域と、非標識プローブハイブリダイズ領域の5'末端領域とが重複するようにこれらのプローブを設定してもよい（ただし、この場合には、固相化プローブの核酸の3'側が支持体に固相化される）。また、標識プローブハイブリダイズ領域は、非標識プローブハイブリダイズ領域及び固相化プローブハイブリダイズ領域と重複しない任意の位置でよい。

【0016】

上記の通り、本発明の方法では、標的核酸10と、標識プローブ12、固相化プローブ14及び非標識プローブ16とをハイブリダイズさせるものであるが、ハイブリダイゼーション反応は、これら4種類の核酸を同時に反応させてもよいし、標的核酸10と、任意のプローブとを逐次的に反応させてもよいし、標的核酸10と、任意の2種類のプローブを反応させた後、第3のプローブを反応させてもよい。反応条件は、特に限定されず、プローブのサイズ等に応じて適宜選択されるが、標的核酸10と、固相化プローブ14と、非標識プローブ16とが共存する条件下におけるハイブリダイゼーション反応は、通常、30℃～60℃で10分間以上であればよく、好ましくは、40℃～50℃で10分間～60分間程度行う。固相化プローブ14と非標識プローブ12のいずれかが存在しない条件下におけるハイブリダイゼーション反応は、上記の条件と同様に行うこともできるし、高温から低温に冷却する条件下で行ってもよい。例えば、下記実施例で

は、先に標的核酸10と、標識プローブ12と、非標識プローブ16とを反応させ、その後、固相化プローブ14を反応させているが、標的核酸10と、標識プローブ12と、非標識プローブ16との反応は、反応液を変性温度（95℃）から氷冷する条件下で行っている。高温から低温に冷却すると、ハイブリダイゼーションが起きる温度を必ず通過するので、標的核酸とプローブとをハイブリダイズさせることができる。

【0017】

ハイブリダイゼーション反応後、支持体18に結合された標識19を測定する。標識19の測定は、各標識に応じた周知の方法により行うことができる。支持体18が粒子の場合には、支持体18を遠心分離や磁力（磁性粒子の場合）を用いて集めた後、標識を測定する。被検試料中に標的核酸10が存在する場合、標識プローブ12は標的核酸10及び固相化プローブ14の核酸部分を介して支持体18に結合され、標的核酸10が存在しない場合には、支持体18に結合されない。支持体18に結合された標識19を測定することにより、被検試料中の標的核酸10を検出することができる。また、支持体19に結合される標識19の量は、被検試料中の標的核酸10の量が多くなるほど多くなるので、標識19を定量することにより標的核酸10を定量することも可能である。

【0018】

標的核酸又は標的核酸の一塩基変異多型を有する変異型核酸を含む被検試料に対して上記した本発明の方法を適用することにより、測定結果から被検試料中の核酸が標的核酸か変異型核酸かを判定することが可能である。これを図1のBを参照して説明する。図1のB中、10'は、図1のAにおける標的核酸10内の塩基Yが一塩基変異を起こした変異型核酸を示し、塩基Yが変異した塩基を○で示す。このように、一塩基が変異した変異型核酸10'と固相化プローブ14とは図1のBに示すようにハイブリダイズしないか、又は一部の固相化プローブ14がハイブリダイズするにしても、ハイブリダイズする固相化プローブの数が、標的核酸にハイブリダイズする固相化プローブの数よりも識別可能な程度に少なくなる。このため、支持体18に結合する標識の量が識別可能な程度に少なくなり、従って、被検試料中に含まれる核酸が、標的核酸か変異型かを判定すること

ができる。

【0019】

さらに、正常型遺伝子と、一塩基変異多型を含む異常型遺伝子とが対立遺伝子になっている、該遺伝子を含む被検試料に対して上記本発明の方法を適用することにより、測定結果から被検試料中の前記遺伝子の接合型を判定することが可能になる。従って、本発明の方法により、目的の遺伝子が、ホモ接合かヘテロ接合かを判定することが可能になる。標的核酸がホモ接合になっている場合に測定される標識量が最も多く、標的核酸と変異型とがヘテロ接合になっている場合が次に多く、変異型がホモ接合になっている場合が最も少ない。従って、本発明の方法に従って、支持体に結合された標識量を測定することにより、対立遺伝子の接合型を判定することが可能になる。

【0020】

本発明は、また、前記標識プローブと、前記非標識プローブと、前記固相化プローブとを少なくとも含み、上記本発明の方法に用いられる核酸測定用キットをも提供する。これらの構成要素は先に説明した通りである。キットは、さらに反応に用いる緩衝液等を含んでいてもよい。

【0021】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0022】

標的核酸であるフコース転位酵素 3 (FUTIII) 遺伝子

FUTIII遺伝子は糖鎖末端にフコースを転移して血液型抗原や癌関連抗原 (CA19-9) の合成に関係している遺伝子で、野生型 (WT) と変異型 (Le1、Le2、Le3) の4種類が知られている。変異の部位として59、508、1067番目の塩基が知られている。(Cancer Res. 58, 512-518(1998), 蛋白質 核酸 酵素Vol.43 No.16(1998))

【0023】

1. 標的核酸の調製

各FUTIII遺伝子を鋳型として用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）法（94℃,1分間、55℃,1分間、72℃,1分間を30サイクル）にてそれぞれの核酸を増幅し、精製<MO BIO: ULTRA CLEAN DNA Purification kit: Catalog #12100-300>後にA260にて吸光度より濃度を測定して調製を行った。以下に各変異部分を含む核酸の増幅に用いたプライマーの組み合わせを示す。59番目の塩基の変異部分を標的とした核酸（WT<59>またはLe<59>）は、センス側を1から20番目<atggatccccctgggtgcagc: 20mer>、アンチセンス側を180から200番目<agcaggatcaggagggtggg: 20mer>のプライマーを用いて1から200番目<200bp>までを増幅し、508番目の塩基の変異部分を標的とした核酸（WT<508>またはLe<508>）は、センス側を407から431番目<acttggagccacccccctaactgcc: 25mer>、アンチセンス側588から612番目<tgagtccggcttccagttggacacca: 25mer>のプライマーを用いて407から612番目<206bp>までを増幅し、1067番目の塩基の変異部分を標的とした核酸（WT<1067>またはLe<1067>）は、センス側887から906番目<tccagagccccaaggacctg 20mer>、アンチセンス側1086から1068番目<tcaggtgaaccaagccgct 19mer>のプライマーを用いて887から1086番目<200bp>までを増幅した。

【0024】

2. 固相化プローブの調製

FUTIII遺伝子の塩基配列に相補的かつ変異の出現する位置を3'末端側から4から6塩基目にくるようにプローブを設計し、5'末端にアミノ基を結合させた固相化用プローブ（図2のa, b, c, dの塩基配列4: 20mer、配列番号7, 10, 11, 16）（アマシャム バイオサイエンス社）を作製し、粒子へ固相化した（固相化粒子）。

【0025】

粒子は、径が5.5 μ mの表面にカルボキシルが修飾されたポリスチレン粒子（Bangs Laboratories, Inc. Catalog Code: PC06N, Polymer Description: P(S/5.5%DVB/5%MMA)) を使用した。

【0026】

固相化プローブの粒子への固相化は、約 10^8 個粒子を0.1M MES(2-[N-モルホリ

ノ] エタンスルホン酸) (pH4.5) 25 μ l に懸濁し、固相化用プローブ (約100pmol / μ l) 5 μ l および EDC (1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩) (10mg/ml) 1.25 μ l を添加して 37°C、1 時間反応 (粒子のカルボキシル基と固相化用プローブのアミノ基との縮合反応) させることで固相化粒子を作製し、0.02% Tween20 (商品名) 溶液で洗浄し、0.1% SDS 溶液洗浄後、0.1M MES (pH4.5) 溶液に置換し 4°C で保存した。

【0027】

3. 非標識プローブの調製

試料核酸と固相化したプローブとのハイブリダイズにおいて、非標識プローブを固相化プローブの 3' 側のどの位置に配置するか記載する。固相化プローブの 3' 側の塩基配列と非標識プローブの 5' 側の塩基配列が 1 塩基離れたプローブから 3 塩基重複するプローブ (約 20mer) (アマシャム バイオサイエンス社) を調製した (図 2 の a, b, c, d の塩基配列 3、配列番号 2~6, 9, 12, 15)。

【0028】

4. 標識プローブの調製

固相化プローブおよび非標識プローブと重複しない標的核酸と相補的な配列を持つプローブでこのプローブの 5' 側に蛍光 (CY3) 標識したプローブ (アマシャム バイオサイエンス社) を調製した (図 2 の a, b, c, d の塩基配列 2、配列番号 1, 8, 13, 14)。

【0029】

5. 測定方法

試料核酸 (800fmol)、非標識プローブ (50pmol) と標識プローブ (1pmol) の入った水溶液 (全量 10 μ l) を熱変性 (95°C ; 5 分間) し、氷上 (1 分間) で冷却後、固相化粒子 (10 μ l の 10 x SSC に懸濁させた約 10 万粒子、最終濃度 5 x SSC) を添加し、標的核酸とハイブリダイズ (40°C ; 2 時間、但し、経時的な検討では 0~2 時間) させ、遠心 (15000rpm, 2 分間) し反応液を除去した。その後、TBS-Triton (10mM Tris-Cl, 0.2% NaCl, 0.1% NaN₂, 0.01% TritonX-100, pH7.2) 50 μ l で洗浄し、再び遠心して測定用の緩衝液 (Beckman Coulter 社、フローサイトメトリー専用シース液、P/N8599600) 200 μ l に懸濁、フローサイトメーター (Beckman Co

ulter社、EPICS-PROFILE II) を用いて粒子上の蛍光強度を測定し、その蛍光強度より標的核酸の有無を同定した。

【0030】

6. 非標識プローブの位置

FUTIII遺伝子の野生型 (図2-a中1:WT<59>; 1~200の200bp) を標的とする核酸とし、固相化粒子にはFUTIII遺伝子の56番目から75番目の配列に対応するアンチセンス側の配列 (図2-a中4) を有するプローブを用い、プローブの5'側と固相化粒子のプローブの3'側と異なる塩基の重複数を持つ非標識プローブ (図2のa中3、配列番号2~6) と標識プローブ (図2-a中2) を用い検出を試みた。固相化プローブの3'側の塩基と非標識プローブの5'側の塩基が1から3塩基が重複した時、標的核酸ではない変異型 (図2-b中1:Le<59>; 1~200の200bp) の蛍光強度にはほとんど変化が観察されなかったにもかかわらず標的核酸であるWT<59>には蛍光強度の上昇が観察された。ことから、固相化プローブの3'側の塩基と非標識プローブの5'側の塩基が1から3塩基重複させることで特異的なハイブリダイズの向上する効果があることが示された (図3)。

【0031】

7. 非標識プローブの効果

FUTIII遺伝子の1067番目の変異遺伝子 (Le<1067>; 887~1086の200bp) を標的核酸とし、固相化粒子のプローブの配列をFUTIII遺伝子の1062番目から1081番目のアンチセンス側 (tgaaccaagccgctttgctg、配列番号16)、非標識プローブを固相化プローブの3'側と3塩基重複するアンチセンス側のプローブ (ctgcgcaccgtctggtacct、配列番号15) と標識プローブ (gcaggccttgcagaaatccag、配列番号14) (図2のd) を用いて検討した。試料核酸に非標識プローブを添加することで経時的に標的とする核酸の蛍光強度が、非標識プローブを添加しない試料に比べ蛍光強度の急激な上昇が観察された (図4)。一方、標的ではない野生型 (WT<1067>; 887~1086の200bp) の核酸では蛍光強度に変化は観察されなかった。非標識プローブが標的とする核酸と固相化粒子との特異的なハイブリダイズの効率を改善していることが示された。

【0032】

8. 標的核酸の検出

FUTIII遺伝子には、各遺伝子型のホモ型とヘテロ型が存在する。そこで標的核酸のホモおよびヘテロの判定が可能であるか記載した。

【0033】

FUTIII遺伝子の59番目の変異核酸を標的核酸とした時(図2のb中1)蛍光強度は $(Le<59>/Le<59>) > (WT<59>/Le<59>) > (WT<59>/WT<59>)$ (図5のa)、508番目の変異核酸を標的核酸とした時(図2-c-1) $(Le<508>/Le<508>) > (WT<508>/Le<508>) > (WT<508>/WT<508>)$ (図5のb)、1067番目の変異核酸を標的核酸とした時(図2-d-1)、 $(Le<1067>/Le<1067>) > (WT<1067>/Le<1067>) > (WT<1067>/WT<1067>)$ (図5のc)となった。(用いた標識体(CY3)プローブ、非標識プローブおよび固相化用プローブの塩基配列は図2のb,c,dを参照)

【0034】

蛍光強度の大きい方から、標的とする核酸のホモ型、標的とする核酸と標的としない核酸のヘテロ型、標的としない核酸のホモ型の順となり、標的核酸の有無および遺伝子型(ホモ、ヘテロ)の判断が可能であった。

【0035】

なお、図2のa,b,c,d中の各参照番号の意味するところを以下にまとめて示す。例えば、図2のa中の1を「a-1」のように記載する。

- a-1 : 標的核酸、野生型 (WT(59))
- a-2 : 標的核酸であるWT (59) を検出するためのCY3標識プローブ
- a-3 : 非標識プローブの設計によって標的核酸(a-1)と固相化プローブ(a-4)のハイブリダイズの特異性の変化を検討するために用いた非標識プローブ
- a-4 : WT (59) の検出用固相化プローブ
- b-1 : 標的核酸、変異型 (Le(59))
- b-2 : 標的核酸であるLe (59) を検出するためのCY3標識プローブ
- b-3 : 標的核酸(b-1)と固相化プローブ(b-4)のハイブリダイズの特異性を高めるために添加する非標識プローブ
- b-4 : Le (59) の検出用固相化プローブ
- c-1 : 標的核酸、変異型 (Le(508))

- c-2 : 標的核酸であるLe (508) を検出するためのCY3標識プローブ
- c-3 : 標的核酸 (c-1) と固相化プローブ (c-4) のハイブリダイズの特異性を高めるために添加する非標識プローブ
- c-4 : Le (508) の検出用固相化プローブ
- d-1 : 標的核酸、変異型 (Le(1067))
- d-2 : 標的核酸であるLe (1067) を検出するためのCY3標識プローブ
- d-3 : 標的核酸 (d-1) と固相化プローブ (d-4) のハイブリダイズの特異性を高めるために添加する非標識プローブ
- d-4 : Le (1067) の検出用固相化プローブ

【 0 0 3 6 】

【発明の効果】

以上のように、本発明により、簡便に短時間でSNPの検出や標的核酸の定量を行うことができる標的核酸の測定方法が提供された。本発明の方法によれば、わずか1塩基の相違を識別することが可能であり、また、わずか1塩基の相違を有する対立遺伝子の接合型の判別が可能である。

【 0 0 3 7 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> FUJIREBIO INC.

<120> Method for measuring nucleic acids and kit therefor

<130> 01724

<160>

【 0 0 3 8 】

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 1

ttgtggcttg gctgcaccca g

21

【 0 0 3 9 】

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 2

ggccagacag cggcgccatg

20

【 0 0 4 0 】

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 3

cggccagaca gcggcgccat

20

【 0 0 4 1 】

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 4

gcggccagac agcggcgcca

20

【 0 0 4 2 】

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 5

tgcgccaga cagcggcgcc

20

【 0 0 4 3 】

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 6

gtgcggccag acagcggcgc

20

【 0 0 4 4 】

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 7

cagcagctga aatagcagtg

20

【 0 0 4 5 】

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 8

ttgtggcttg gctgcaccca g

21

【 0 0 4 6 】

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 9

20

gcggccagac agcggcgcca

【 0 0 4 7 】

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 10

20

agcagctgaa atagccgtgc

【 0 0 4 8 】

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 11

20

atcttcacgc cctacggctg

【 0 0 4 9 】

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 12

20

tggtctggagc cgtggtccgg

【 0 0 5 0 】

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 13

ggtggcctgg gcggtgtcca actgg

25

【 0 0 5 1 】

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 14

gcaggccttg cagaaatcca g

21

【 0 0 5 2 】

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 15

ctgcgcaccg tctggtacct

20

【 0 0 5 3 】

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 16

tgaaccaagc cgctttgctg

20

【 0 0 5 4 】

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 17

atggatcccc tgggtgcagc

20

【 0 0 5 5 】

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 18

agcaggatca ggagggtggg

20

【 0 0 5 6 】

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 19

25

acttgagacc accccctaac tgcca

【 0 0 5 7 】

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 20

25

tgagtccggc ttccagttgg acacc

【 0 0 5 8 】

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 21

20

tccagagccc caaggacctg

【 0 0 5 9 】

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 22

tcaggtgaac caagccgct

19

【 0 0 6 0 】

<210> 23

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atggatcccc tgggtgcagc caagccacaa tggccatggc gccgctgtct ggccgcactg 60
ctatttcagc tgctgggtggc tgtgtgtttc ttctcctacc tgcgtgtgtc ccgagacgat 120
gccactggat cccctagggc tcccagtggg tcctcccgac aggacaccac tcccacccgc 180
cccaccctcc tgatcctgct 200

【 0 0 6 1 】

<210> 24

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

atggatcccc tgggtgcagc caagccacaa tggccatggc gccgctgtct ggccgcacgg 60
ctatttcagc tgctgggtggc tgtgtgtttc ttctcctacc tgcgtgtgtc ccgagacgat 120
gccactggat cccctagggc tcccagtggg tcctcccgac aggacaccac tcccacccgc 180
cccaccctcc tgatcctgct 200

【 0 0 6 2 】

<210> 25

<211> 206

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

acttgagcc accccctaac tgccagcacc tggaagccct ggacagatac ttcaatctca 60

ccatgtccta ccgcagcgac tccgacatct tcacgcccta cggctggctg gagccgtggt 120
ccggccagcc tgcccaccca ccgctcaacc tctcggccaa gaccgagctg gtggcctggg 180
cgggtgtccaa ctggaagccg gactca 206

【 0 0 6 3 】

<210> 26
<211> 206
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 26

acttgagacc accccctaac tgccagcacc tggaagccct ggacagatac ttcaatctca 60
ccatgtccta ccgcagcgac tccgacatct tcacgcccta cagctggctg gagccgtggt 120
ccggccagcc tgcccaccca ccgctcaacc tctcggccaa gaccgagctg gtggcctggg 180
cgggtgtccaa ctggaagccg gactca 206

【 0 0 6 4 】

<210> 27
<211> 200
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 27

tccagagccc caaggacctg gcccggtacc tgcaggagct ggacaaggac cacgcccgt 60
acctgagcta ctttcgtgg cgggagacgc tgcggcctcg ctccttcagc tgggcactgg 120
atttctgcaa ggcctgctgg aaactgcagc aggaatccag gtaccagacg gtgcgcagca 180
tagcggttg gttcacctga 20

0

【 0 0 6 5 】

<210> 28
<211> 200
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 28

```

tccagagccc caaggacctg gcccgtacc tgcaggagct ggacaaggac cacgcccgt      60
acctgagcta ctttcgctgg cgggagacgc tgcggcctcg ctcccttcagc tgggcactgg    120
atttctgcaa ggcctgctgg aaactgcagc aggaatccag gtaccagacg gtgcgcagca    180
aagcggcttg gttcacctga                                         200

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の方法を説明するための模式図である。

【図 2】

本発明の実施例で用いた標的核酸及び各種プローブの塩基配列及びハイブリダイズする領域を示す図である。

【図 3】

非標識プローブの位置による蛍光強度の変化を示したグラフである（横軸の数字はFUT III DNAの塩基配列に対応する非標識プローブの位置を示し、カッコ内は非標識プローブの5'側と固相化プローブの3'側が重複する塩基数を現している）。

【図 4】

非標識プローブの添加の有無による経時的な蛍光強度の変化を示したグラフである。

【図 5】

標的核酸の遺伝子型（ホモ型、ヘテロ型）による蛍光強度の違いを示したグラフである。

【符号の説明】

- 10 標的核酸
- 10' 変異型核酸
- 12 標識プローブ
- 14 固相化プローブ
- 16 非標識プローブ
- 18 支持体

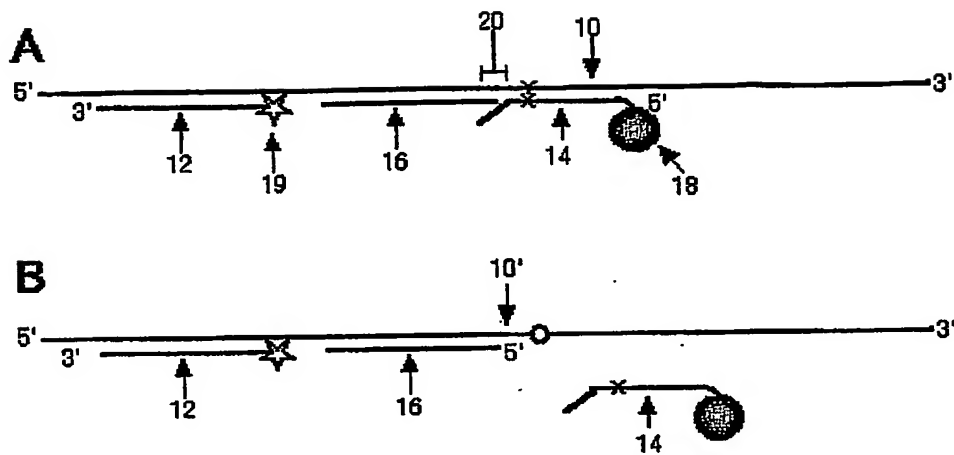
1 9 標識

2 0 重複領域

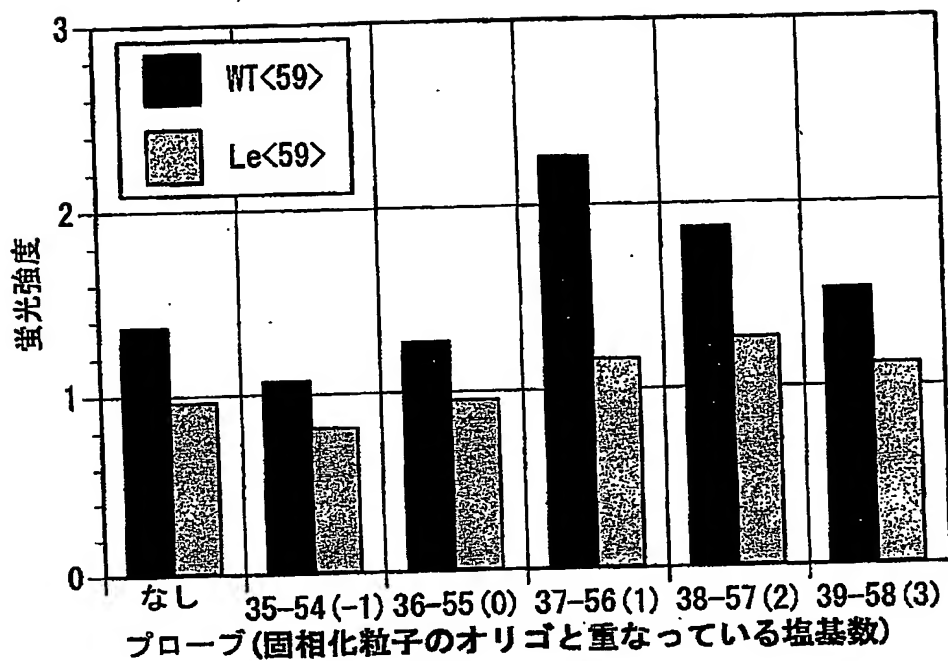
【書類名】

図面

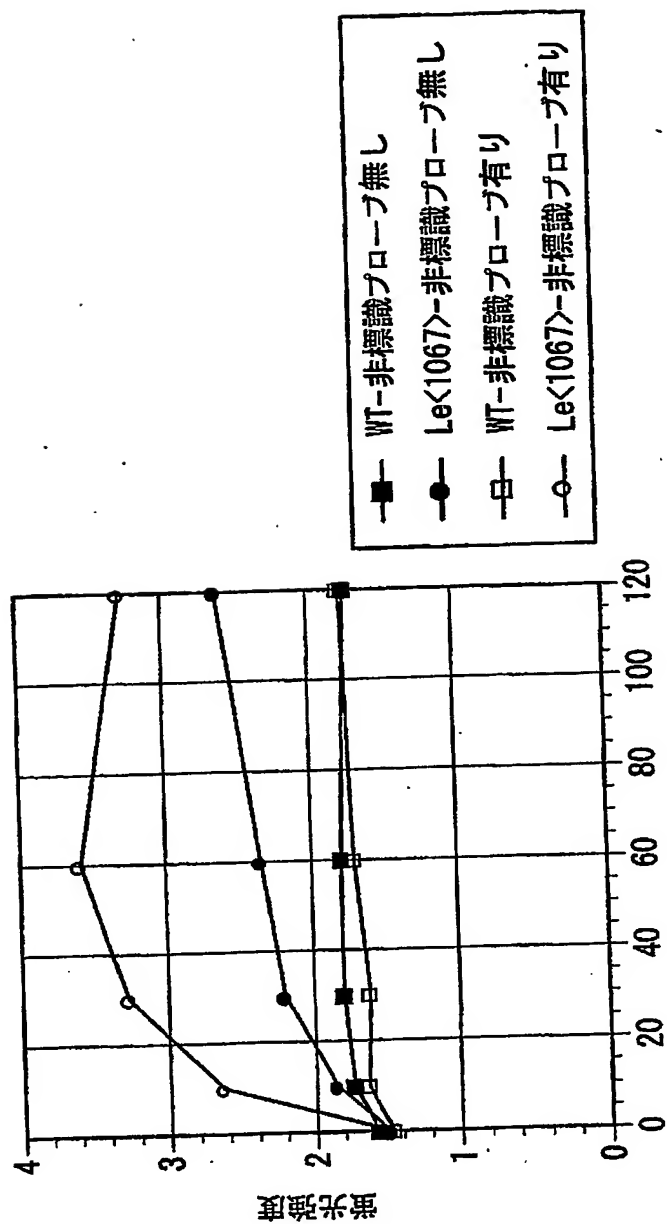
【図1】



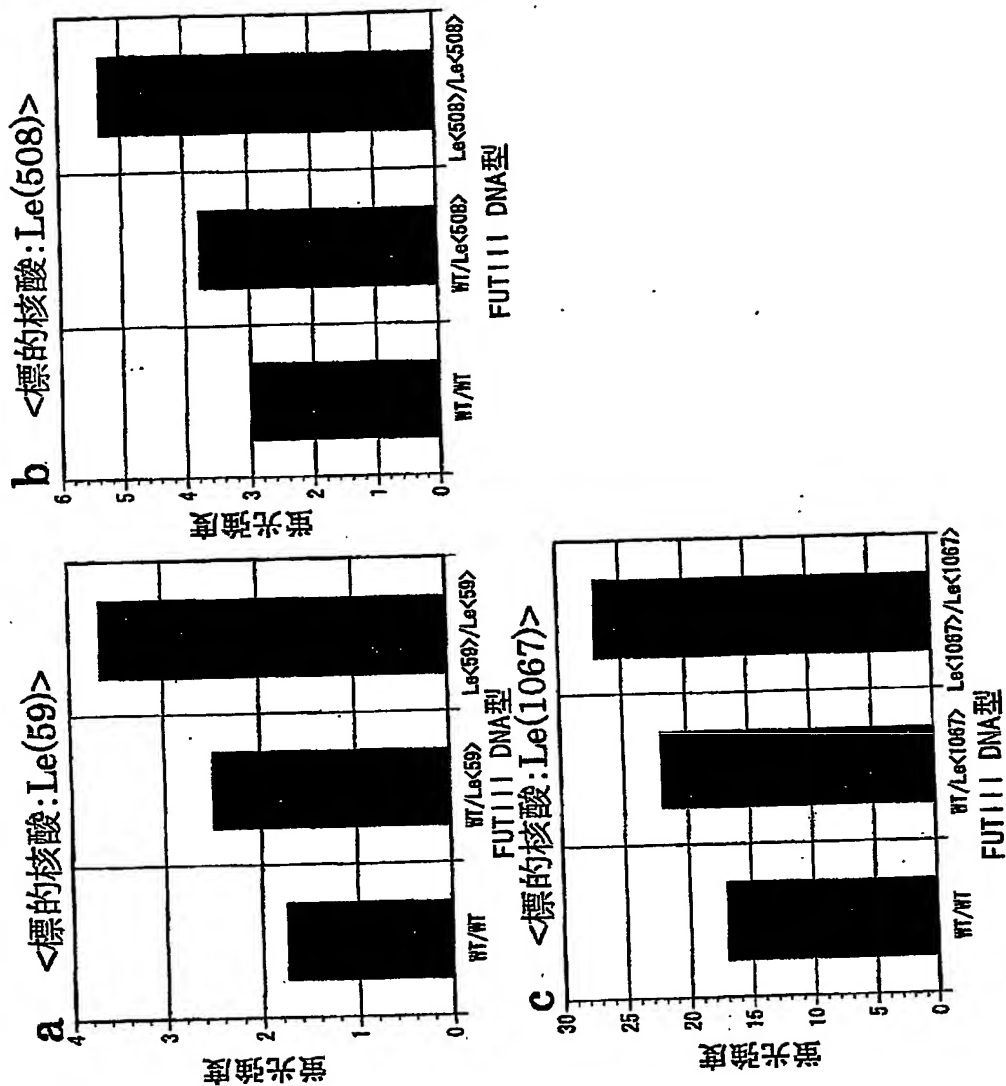
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 熟練した技術を要することなく、簡便に短時間でSNPの検出や標的核酸の定量を行うことができる標的核酸の測定方法を提供すること。

【解決手段】 標的核酸と、標的核酸とハイブリダイズする、標識された核酸から成る標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸から成る非標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸が支持体に結合されて成る固相化プローブとを反応させ、前記支持体に結合された前記標識プローブの標識を測定することから成る標的核酸の測定方法であって、前記非標識プローブがハイブリダイズする領域の端部領域と、前記固相化プローブがハイブリダイズする領域の端部領域とが重複している、標的核酸の測定方法を提供した。

【選択図】 図1

特2002-097407

認定・付加情報

特許出願の番号

特願2002-097407

受付番号

50200461437

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0094

作成日

平成14年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年 3月29日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000237204]

1. 変更年月日	1997年 5月12日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
氏 名	富士レビオ株式会社